

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **03167475 A**

(43) Date of publication of application: **19 . 07 . 91**

(51) Int. Cl

G01N 33/543

(21) Application number: **01304614**

(22) Date of filing: **27 . 11 . 89**

(71) Applicant: **HITACHI LTD**

(72) Inventor: **TAKAHASHI SATOSHI
OKANO KAZUNOBU
YASUDA KENJI
TOKINAGA DAIZO
IMAI KAZUNARI**

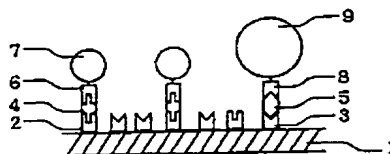
(54) **METHOD AND APPARATUS FOR IMMUNOASSAY**

(57) Abstract:

PURPOSE: To measure many items with high accuracy in relation to immunoassay using fine particles.

CONSTITUTION: To the anti-human α -fetoprotein (AFP) and carcinoembryonic fetal antigen (CEA) antibody 3 immobilized on a reaction container 1, human AFP 4 and CEA 5 in sample serum are bonded by antigen-antibody reaction. Further, a fine particle 7 having a diameter of $0.41\mu\text{m}$ is bonded to human AFP 4 through an anti-human AFP antibody 6 and a fine particle 9 having a diameter of $0.76\mu\text{m}$ is bonded to CEA 5 through an anti-CEA antibody 8. The reaction container 1 having these fine particles caught thereby is placed on the stage of a microscope and the microscopic images of the fine particles are projected on a TV camera.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio



⑫ 公開特許公報(A)

平3-167475

⑪ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 平成3年(1991)7月19日

G 01 N 33/543

E
G7906-2G
7906-2G

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全5頁)

⑭ 発明の名称 免疫測定方法および装置

⑮ 特 願 平1-304614

⑯ 出 願 平1(1989)11月27日

⑰ 発 明 者 高 橋 智 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑱ 発 明 者 岡 野 和 宣 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲ 発 明 者 保 田 健 二 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑳ 発 明 者 時 永 大 三 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

㉑ 出 願 人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

㉒ 代 理 人 弁理士 小川 勝男 外1名

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

免疫測定方法および装置

2. 特許請求の範囲

1. 測定試料中の複数の被測定物質のそれぞれと特異的に結合する物質を固定化した反応容器と、該被測定物質のそれぞれと特異的に結合する物質をそれぞれ固定化した複数の異なる種類の微粒子を使用し、該反応容器と測定試料と該微粒子を接触させることにより、微粒子を反応容器に捕捉し、微粒子の種類と微粒子数を計数する免疫測定方法。
2. 微粒子の種類によって複数の種類に識別することのできる微粒子を使用することを特徴とする特許請求の範囲第1項記載の免疫測定方法。
3. 反応容器に捕捉した微粒子を画像により識別し、その種類と数を計数することを特徴とする特許請求の範囲第1項または第2項記載の免疫測定方法。
4. 画像入力装置と、画像入力装置からの像を画

像処理して微粒子の種類と数を計数する装置とからなる免疫測定装置。

5. 個々の微粒子の大きさを計数し、同じ種類の粒子毎にその数を計数する処理を行うことを特徴とする特許請求の範囲第4項記載の免疫測定装置。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、微粒子を用いた免疫測定方法およびその装置に関するものである。

〔従来の技術〕

微粒子を使用した免疫測定方法として、表面に抗体を結合させたラテックス粒子と抗原とを反応させ、抗原抗体反応によって生成するラテックス粒子の凝集状態を吸光度または散乱光強度により測定して抗原濃度を測定する方法が知られている(ぶんせき, 16, 805(1987))。しかし、ラテックス粒子の凝集状態は一定ではなく分布を持つため、反応液全体の平均値を測定するこれらの方法では、抗原濃度の算出に系統的な問題があり、極

低濃度の抗原量の定量などが困難であった。

そこで、反応液をフローセルに導いて、セル内を流れる微粒子の散乱光または蛍光強度を測定する方法が開発された〔検査と技術、16, 607(1988)、特開昭62-81567、ジャーナル オブ イムノロジカル メソッズ (J. Immunol. Methods) 18, 33 (1977)〕。この方法によれば、個々の凝集塊の大きさを計測することができることから、抗原濃度の算出精度を向上させることができる。また、蛍光微粒子を用いて抗原抗体反応を起こさせ、その凝集像を画像処理することにより凝集状態を解析し抗原濃度を算定する方法もある(特開昭64-35373)。

上記従来方法は、ホモジニアス系でラテックス粒子表面の抗体(または抗原)と抗原(または抗体)とが反応して凝集をおこすことを利用している。そのため、抗原過剰領域で抗原抗体反応が抑制される現象、いわゆるプロゾーン現象が避けられない。また、試料中に共存する散乱体や、色素等の吸収体・蛍光体の影響を完全に除去すること

は困難である。さらに、抗原と抗体とが1対1に結合するとは限らないため、凝集塊の数を計数する従来方式では特に極低濃度領域での計数値の誤差が発生しやすいという問題がある。

プロゾーン現象や共存物質の影響を受けない方法として、特開昭56-151357のようなヘテロジニアス系の反応がある。しかし、この方法では簡便性・多項目測定が可能になるが、高感度化に対する配慮がなされていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

本発明の目的は、上記従来技術の問題点を解決し、微粒子を利用した高感度で多項目測定ができる免疫測定方法およびその装置を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

上記目的は、測定試料中の複数の被測定物質のそれぞれと特異的に結合する物質を固定化した反応容器と、該被測定物質のそれぞれと特異的に結合する物質をそれぞれ固定化した複数の異なる種類の微粒子を使用し、反応容器に固定化した被測定

物質と特異的に結合する物質と、測定試料中の被測定物質と、微粒子に固定化した被測定物質と特異的に結合する物質とを接触させて結合させることにより、微粒子を反応容器に捕捉し、異なる種類ごとの微粒子数を計数することにより達成できる。

複数の異なる種類の微粒子には、径の異なる微粒子が使用できる。

反応容器に捕捉した微粒子の種類と数を計測するには、微粒子の像を画像化し、画像処理することによって達成することができ、顕微鏡、画像入力装置(TVカメラ等)、及び画像処理装置から成る装置によって達成できる。まず、画像入力装置により得られた画像をもとに、個々の微粒子の大きさを測定し、径程の違いにより複数の微粒子群に分類し、各分類毎の微粒子数を計数する。

測定試料中の被測定物質および被測定物質と特異的に結合する物質の組合せとしては、抗原(または抗体)と抗体(または抗原)が代表的な組合せである。その他に、例えばホルモンとレセプタ

一、糖とレクチンなどの組合せも可能である。

計数される粒子としては、ポリスチレン、アクリル、スチレン-ブタジエン共重合体、スチレン-アクリル酸共重合体などの比重が1~1.4程度の材質の粒子が適当である。比重が1~1.4程度の粒子のとき、反応が効果的に行われる。またその粒径は、3 μ m以下、特に0.1~1 μ mの範囲が適当である。この粒子の表面に抗体(または抗原)などを結合させるには、通常知られている物理吸着、化学結合などが利用できる。

本発明によりヒト α -フェトプロテイン(AFP)、癌胎児性抗原(CEA)、フェリチン、風疹抗体、エイズウィルス抗体、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)など種々の抗原、抗体、ホルモンなどが測定できる。

〔作用〕

本発明によれば、複数の被測定物質のそれぞれに異なる径の微粒子が結合するため、同一容器内で多種類の被測定物質を計測でき、多項目化が達成できる。さらに、被測定物質の1個に対して

1個の微粒子が結合することから、高感度に被測定物質を計測することができる。

【実施例】

以下、本発明の実施例を、AFPとCEAの2つの抗原を例にとり、多項目計測方法について説明する。

固定化抗体の調製：

マイクロプレートのウェルを反応容器とし、内面にAFPとCEAに対する抗体を固定化する。平底のマイクロプレートのウェルに濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗ヒトAFP抗体溶液 $25\mu\text{L}$ と濃度 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗CEA抗体溶液 $25\mu\text{L}$ を注入し、2時間間欠的に攪拌し反応させて抗ヒトAFP抗体および抗CEA抗体を固定化する。

微粒子標識抗体の調製：

直径が $0.41\mu\text{m}$ および $0.76\mu\text{m}$ で、表面にカルボキシル基を有するアクリル系微粒子を標識物として使用する。カルボジイミド法により、 $0.41\mu\text{m}$ 径の微粒子の表面に抗ヒトAFP抗体を固定化し（固定化量約 $0.7\text{mg}/\text{g}$ ）、微

粒子標識抗ヒトAFP抗体を調製する。同様に、 $0.76\mu\text{m}$ 径の微粒子の表面に抗CEA抗体を固定化し（固定化量約 $0.7\text{mg}/\text{g}$ ）、微粒子標識抗CEA抗体を調製する。

AFPとCEAを含む試料血清 $50\mu\text{L}$ を抗ヒトAFP抗体と抗CEA抗体を固定化した反応容器（ウェル）に注入して、2時間反応させ、測定抗原（AFPおよびCEA）を反応容器（ウェル）に捕捉する。その後、 0.5% BSAを含むリン酸緩衝液（ 0.5% BSA-PBS）で洗浄し、反応しなかった抗原などを除去する。

次に、微粒子濃度が 0.1% になるように調製した微粒子標識抗ヒトAFP抗体溶液 $60\mu\text{L}$ および微粒子標識抗CEA抗体溶液 $60\mu\text{L}$ を注入し、5時間静置して反応させ、反応容器（ウェル）に捕捉したヒトAFPおよびCEAに微粒子標識抗体を結合させる。次に、 0.5% BSA-PBSで静かに洗浄し、余分の微粒子標識抗体を除去する。

このときの抗原と微粒子標識抗体の結合状態は、

第1図のような模式図で表すことができる。反応容器（ウェル）1上に固定化された抗ヒトAFP抗体2と抗CEA抗体3に試料血清中のヒトAFP4とCEA5が抗原抗体反応により結合する。さらにヒトAFP4には、抗ヒトAFP抗体6を介して $0.41\mu\text{m}$ 径の微粒子7が結合する。またCEA5には、抗CEA抗体8を介して $0.76\mu\text{m}$ 径の微粒子9が結合する。

なお、微粒子標識抗体溶液の微粒子の濃度は、 0.01% から 1% が適当である。比重のやや小さいポリスチレン微粒子を使用した場合は、その微粒子濃度は、 0.05% から 5% が適当である。その他の微粒子についても、微粒子濃度は微粒子の比重の大きさや粒径等によって決定される。

第2図に平底のマイクロプレートのウェルに捕捉した微粒子の径と数を計測する装置の概略図を示す。装置は（例立型の）顕微鏡10とTVカメラ11と画像処理装置12、さらにモニターテレビ13と出力装置14とで構成される。

微粒子が捕捉されたマイクロプレートのウェル

15を顕微鏡10のステージに載せ、ウェル15内の微粒子16の顕微鏡像をTVカメラ11で写しとる。顕微鏡像は通常の透過像の他に位相差・微分干渉像等が使用できる。

本実施例では、位相差像により顕微鏡した、TVカメラ11からの出力を画像処理装置12で処理する。まず、像を8ビットにデジタル化して画像メモリに貯蔵する。この操作を64フレーム行ない、像のS/Nを良くする。得られた画像データから微粒子の径と数を計測する。同じ粒径の微粒子でもバラツキがあり、また顕微鏡焦点位置と微粒子の局在位置とのずれ等により、見掛けの粒径は多少変動する。そこで、計測された微粒子を、粒径が $0.3\mu\text{m}\sim 0.6\mu\text{m}$ の範囲の微粒子群と粒径が $0.6\mu\text{m}\sim 0.9\mu\text{m}$ の範囲の微粒子群とに分類し、それぞれの分類ごとに微粒子数を計数した。 $0.3\mu\text{m}$ より小さいものおよび $0.9\mu\text{m}$ より大きいものは、ゴミ等と判断して、計数から除外した。

本方法によりヒトAFPまたはCEA濃度を定

量するには、あらかじめ濃度が既知の試料で検量線をつくり、それぞれの粒子数から濃度を算定すれば良い。

本実施例では、測定抗原と標識物である微粒子との結合比率が一定となるため、精度が高く、高感度な定量が可能になった。また、抗原過剰領域で抗原抗体反応が抑制される現象、いわゆるプロゾーン現象が生じないため、高濃度の抗原濃度域での定量も可能である。

【発明の効果】

本発明によれば、抗原抗体反応などの特異的な反応により、測定抗原などの被測定物質に対して一定比率の微粒子を反応容器に捕捉することができ、また試料中に含まれる光散乱体等の影響を受けないため、高感度に抗原濃度を定量できる効果がある。さらに、被測定物質の種類に応じて異なる粒径の微粒子を結合させることにより、多項目計測が可能になる。

4. 図面の簡単な説明

第1図は本発明の実施例における抗原と微粒子

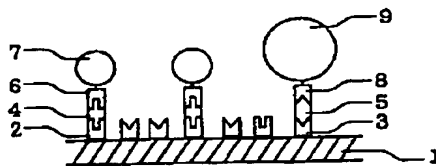
標識抗体の結合状態を示す模式図、第2図は本発明の一実施例の測定装置の概略図である。

符号の説明

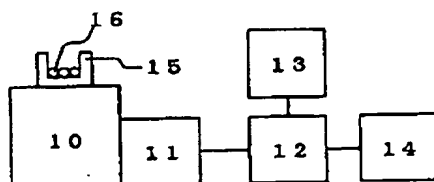
- 1…反応容器（ウェル）
- 2…抗ヒトAFP抗体
- 3…抗CEA抗体
- 4…ヒトAFP
- 5…CEA
- 6…抗ヒトAFP抗体
- 7…0.41 μ m径の微粒子
- 8…抗CEA抗体
- 9…0.76 μ m径の微粒子
- 10…（倒立型）顕微鏡
- 11…TVカメラ
- 12…画像処理装置
- 13…モニターテレビ
- 14…出力装置
- 15…反応容器（マイクロプレートのウェル）
- 16…微粒子

代理人 弁理士 小川 勝男

第1図



第2図



第1頁の続き

②発 明 者 今 井 一 成 茨城県勝田市市毛882番地 株式会社日立製作所那珂工場
内